

**UNIVERSITÀ
di VERONA**Dipartimento
di **BIOTECNOLOGIE****RELAZIONE SCIENTIFICA****Assegno di Ricerca (AdR2595/16)**

<i>Nome e Cognome del Beneficiario</i>	Lucia Cenci
<i>Titolo del Programma di Ricerca</i>	Nanomateriali stampati per lo sviluppo di sistemi/protocolli innovativi applicati alla diagnostica clinica nel buon invecchiamento.
<i>Settore Scientifico Disciplinare di riferimento</i>	CHIM/01 Chimica analitica
<i>Nome e Cognome del Responsabile Scientifico</i>	Alessandra Maria Bossi
<i>Durata dell'Assegno di Ricerca (da...a...)</i>	01/04/2016 – 31/03/2017
<i>Periodo di riferimento della relazione (da...a...)</i>	01/04/2016 – 31/03/2017
<i>Note (es.: eventuali periodi di sospensione dell'Assegno, ecc.)</i>	



DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA (*presupposti/obiettivi, metodologie applicate, risultati intermedi raggiunti, discussione*)

Presupposti

L'assegno di ricerca (AdR) si inserisce all'interno di un progetto che mira alla preparazione di nano-materiali polimerici e alla loro applicazione per lo sviluppo di nuovi approcci clinico/diagnostici. Alcuni esempi di applicazioni sono: la diagnosi precoce di malattie cardiovascolari e la valutazione di problemi connessi ad abitudini di vita distruttive (abuso alcolico) o costruttive (presenza nella dieta di peptidi bioattivi), in armonia con la promozione del "wellbeing" e con le politiche di "buon invecchiamento".

L'obiettivo del progetto era la sintesi di nano-materiali polimerici con proprietà di riconoscimento verso determinati analiti mediante la tecnica dello stampo molecolare e la loro integrazione con metodi di biochimica clinica, quali dosaggi su piastra e spettrometria di massa, per la determinazione di marcatori correlati a patologie cardiovascolari e abuso alcolico.

In particolare, le fasi del progetto relative all'AdR insistono sullo sviluppo, sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle polimeriche stampate mediante la tecnologia dei Molecularly Imprinted Polymers (MIPs). I vantaggi nell'uso di MIPs in campo analitico sono ben evidenti in letteratura e riassumibili in termini di: stabilità alla temperatura, economicità della sintesi, versatilità di stampo contro qualsivoglia analita di interesse. Ulteriori vantaggi derivano dalla preparazione dei MIPs in forma di nanoparticelle: la maggiore velocità del trasferimento di massa permette infatti cinetiche di legame rapide e pertanto rende le nanoparticelle stampate ideali per l'integrazione in protocolli analitici rapidi, sensori e dosaggi.

Obiettivi della ricerca:

- Selezionare gli epitopi da utilizzare come molecola-stampo o template;
- sintetizzare le nanoparticelle MIPs (nano-MIPs) in grado di legare tali epitopi;
- caratterizzare le nano-MIPs dal punto di vista chimico-fisico e funzionale;
- integrare le nano-MIPs in metodi analitici o dosaggi.

Metodologie Applicate:

- analisi Fingerprint per la selezione degli epitopi d'interesse;
- sintesi di nanoMIPs;
- indagine delle caratteristiche chimico-fisiche delle nano-MIPs con Dynamic Light Scattering e Scanning Electron Microscopy;
- indagine delle caratteristiche di legame delle nano-MIPs con Isothermal Titration Calorimetry;
- indagine della selettività e capacità di binding delle nano-MIPs con esperimenti di legame in HPLC o SDS-PAGE.



Risultati e discussione

Nella prima fase del lavoro sono stati selezionati gli epitopi della transferrina umana (HTR) che potessero svolgere le funzioni di marcatori dell'abuso cronico di alcol. HTR infatti, presenta una serie di isoforme scarsamente glicosilate la cui concentrazione nel siero è strettamente correlata all'assunzione cronica di alcol: la glicofoma fisiologica possiede due N-glicani (su Asn⁴¹³ e Asn⁶¹¹) con quattro residui di acido sialico (tetrasialo-HTR) mentre l'asialo-HTR, monosialo-HTR e disialo-HTR sono presenti solo in condizioni di abuso alcolico.

Sono stati quindi scelti come epitopi due peptidi contenenti i siti di sialilazione: CGLVPVLAENYNK (CK13) e FGSNVTDCSGN (FN11). La selezione è avvenuta mediante il metodo razionale proposto in Bossi *et al.* Anal. Chem. (2012). Tali peptidi, usati come molecola-stampo o template per la sintesi di nano-MIPs, garantirebbero la discriminazione tra asialo-HTR e le isoforme glicosilate. Si è scelto di iniziare il lavoro con il peptide CK13.

Per la sintesi delle nano-MIPs è stata utilizzata la polimerizzazione per precipitazione in ambiente acquoso con una composizione di monomeri standard: 4% (mol/mol) di tert-butilacrilammide (TBAm), 8% (mol/mol) di acrilammide (Aam) e acido itaconico (IA) e 80% (mol/mol) di bis-acrilammide (BIS) come cross-linker. I monomeri scelti presentano caratteristiche chimico-fisiche differenti (idrofobicità, neutralità vs carica) e perciò massimizzano le possibili interazioni con il template e garantiscono una buona fedeltà di stampo. Parallelamente, sono state sintetizzate le nanoparticelle di controllo, non stampate (nano-NIPs) con la medesima composizione in monomeri ma in assenza del template.

Le nano-MIPs/NIPs sono state caratterizzate sia dal punto di vista fisico (dimensioni, polidispersità, forma) che funzionale (capacità di binding, selettività, affinità). Le dimensioni sono state studiate mediante Dynamic Light Scattering (DLS) mentre la loro forma è stata osservata mediante microscopia elettronica a scansione. Le nanoparticelle mostrano le dimensioni attese (20-60 nm) e sono caratterizzate da una bassa polidispersità, con forma regolare e quasi sferica. Questo è in accordo con quanto viene riportato in letteratura sul metodo di sintesi prescelto. Le prestazioni delle nano-MIPs in termini di affinità sono state misurate mediante Isothermal Titration Calorimetry e le relative costanti di dissociazione per i complessi nano-MIP/analita sono risultate nel basso nanomolare. La capacità di binding e la selettività delle nano-MIPs è stata invece valutata con una serie di esperimenti in batch e successiva quantificazione del peptide legato mediante HPLC. Le nano-MIPs sono state anche testate per la loro capacità di legare la HTR intera e la costante di dissociazione si è confermata nel range nanomolare. La valutazione di capacità di binding e selettività è stata effettuata, anche in questo caso, con esperimenti in batch seguiti però dalla densitometria su SDS-PAGE.

Infine, le nano-MIPs sono state messe alla prova con campioni di siero reali per valutare la loro capacità di legare HTR in un ambiente altamente complesso: è stata dimostrata la loro capacità di arricchimento in HTR tuttavia restano da ottimizzare le fasi di lavaggio ed eluizione.

Si è poi proceduto a testare le potenzialità delle nano-MIPs in sistemi analitici, per valutarne l'idoneità allo sviluppo dei nuovi protocolli di dosaggio auspicati nel progetto.

In particolare, le nano-MIPs sono state studiate in accoppiamento alla spettrometria di massa MALDI-TOF come ulteriore sviluppo del lavoro Cenci *et al.* J. Mol. Recogn. (2016). In particolare, sono state confrontate le prestazioni delle nano-MIPs con quelle delle micro-MIPs oggetto del precedente lavoro: i migliori risultati in termini di efficienza di ionizzazione e riproducibilità dei risultati sono stati ottenuti con le nano-MIPs grazie alla maggiore omogeneità del materiale, all'alta



efficienza di stampo e alla maggiore uniformità ed accessibilità dei siti di legame.

Parallelamente, è stato studiato mediante DLS il comportamento delle nano-MIPs in presenza di acetonitrile poichè le matrici che si usano in spettrometria di massa MALDI-TOF sono sciolte in una soluzione acquosa di tale solvente. È stato dimostrato che le nano-MIPs sono soggette al fenomeno dello shrinking (strizzamento): l'acetonitrile causa il collassamento del reticolo polimerico con conseguente fuoriuscita delle molecole d'acqua intrappolate al suo interno esattamente come avviene per un idrogel macroscopico. La nostra ipotesi, dimostrata in Bertolla *et al.* ACS Appl. Mater. Interfaces (2017), è che tale effetto favorisca l'esposizione delle molecole (proteina o peptide) legate alle nano-MIPs e la loro ionizzazione nel momento in cui le nano-MIPs sono accoppiate al MALDI.

In conclusione, le nano-MIPs stampate con uno dei due epitopi individuati (CK13) hanno mostrato affinità e selettività molto buone nei confronti di HTR e una buona capacità di arricchimento di HTR da campioni di siero reali. Tali nanoparticelle sono state efficacemente integrate con la spettrometria di massa MALDI-TOF dimostrando di essere adatte allo sviluppo di un sistema di dosaggio rapido ed efficace.

DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA SVOLTA ALL'ESTERO (eventuale)



DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NELL'AMBITO DEL DOTTORATO DI RICERCA (eventuale)

DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DIDATTICA COLLEGATA (eventuale)

SEMINARI/CONFERENZE TENUTI

RISULTATI DELLA RICERCA (pubblicazioni, rapporti, brevetti, etc.)

Pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali con peer review:

1. Molecularly imprinted polymers coupled to matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry for femtomoles detection of cardiac troponin I peptides. L. Cenci, A. Anesi, M. Busato, G. Guella and A. M. Bossi. **2016**, *Journal of Molecular Recognition*, **29**, p.41
2. Screening of the binding properties of molecularly imprinted nanoparticles via capillary electrophoresis. G. Musile, L. Cenci, E. Andreetto, E. Ambrosi, F. Tagliaro, A. M. Bossi. **2016**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **408**, p.3435



3. Guided Folding Takes a Start from the Molecular Imprinting of Structured Epitopes. L. Cenci, G. Guella, E. Andreetto, E. Ambrosi, A. Anesi, A. M. Bossi. **2016**, *Nanoscale*, **8**, 15665
4. Solvent-responsive molecularly imprinted nanogels for targeted protein analysis in MALDI-TOF mass spectrometry. M. Bertolla, L. Cenci, A. Anesi, E. Ambrosi, F. Tagliaro, L. Vanzetti, G. Guella, A. M. Bossi. **2017**, *ACS Applied Materials & Interfaces*, **9**, 6908

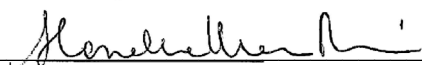
Poster a convegni internazionali:

1. Surface plasmon resonance based on molecularly imprinted nanoparticles for the picomolar detection of the iron regulating hormone Heparin-25. L. Cenci, D. Girelli, A.M. Bossi. Atti di "European Iron Club-Meeting in Innsbruck", Innsbruck, Austria, 7-10 Aprile 2016
2. Investigation of different cation-exchange polymers as a new approach for the determination of basic drugs in urine by solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. G. Musile, L. Cenci, E. Piletska, R. Gottardo, A.M. Bossi, F. Bortolotti. Atti di "40th International Symposium on Capillary Chromatography and 13th GCxGC Symposium", Riva del Garda, 29 Maggio-3 Giugno 2016
3. Capillary electrophoresis screening of the binding affinity of Molecularly Imprinted Nanoparticles. L. Cenci, G. Musile, F. Tagliaro, A.M. Bossi. Atti di "The 9th International Conference on Molecular Imprinting (MIP2016)", Lund, Svezia, 26-30 Giugno 2016

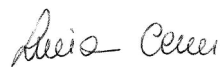
Capitoli di libro:

1. A.M. Bossi, L. Cenci, R. Tognato. Application of nanomaterials to molecularly imprinted polymers in *Molecularly Imprinted Polymers for Analytical Chemistry Applications*. W. Kutner & P.S. Sharma Eds. The Royal Society of Chemistry, Londra, UK (in press)

Il Responsabile Scientifico


(Firma)

L'Assegnista di Ricerca


(Firma)